

中华鲟卵黄脂磷蛋白的分离纯化及性质分析

庄平^{1,2}, 丁建文^{1,2}, 侯俊利¹, 章龙珍¹, 刘鉴毅¹, 刘健³, 张涛¹, 田美平¹

(1. 中国水产科学研究院 东海水产研究所 农业部海洋与河口渔业重点开放实验室, 上海 200090; 2. 华东理工大学 生物工程学院, 上海 200237; 3. 上海市长江口中华鲟自然保护区管理处, 上海 200002)

摘要: 采用 Sephacryl S-300 凝胶过滤和 DEAE Fast Flow 阴离子交换两种层析法分离纯化中华鲟 (*Acipenser sinensis*) 卵黄脂磷蛋白 (lipovitellin, Lv), 对每个峰进行 SDS-PAGE 电泳及油红 O、甲基绿和 Schiff 试剂特异染色, 峰 II 蛋白均呈阳性, 表明峰 II 蛋白为中华鲟卵中的一种卵黄脂磷蛋白, SDS-PAGE 电泳分析表明其由一种分子质量为 43.5 ku 的亚基构成。对中华鲟 Lv 氨基酸组成进行研究, 证明其是一种含有相对较多天冬氨酸、谷氨酸、缬氨酸和亮氨酸的蛋白。

关键词: 中华鲟 (*Acipenser sinensis*); 卵黄脂磷蛋白; 凝胶过滤层析; 离子交换层析

中图分类号: S917

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2010)06-0016-06

中华鲟 (*Acipenser sinensis*) 为大型溯河洄游性鱼类, 软骨硬鳞类鲟形目^[1]。主要分布在我国东海、黄海, 在长江产卵繁殖, 是长江特有的 3 种鲟鱼之一, 也是目前地球上最古老最原始的辐鳍鱼类之一, 被誉为“活化石”^[2]。近来因环境污染和水利工程阻断其洄游通道等原因, 其生态环境遭到严重的破坏, 数量锐减, 被列为国家一级重点保护动物^[3]。

卵黄是鱼类胚胎发生期的主要营养物质, 卵黄的数量和质量对于早期幼体维持生命和生长发育至关重要^[4]。卵黄积累过程是鱼类性腺发育中的重要过程。鲟鱼类在孵出后的 6~7d 内, 其幼体完全依赖卵黄来满足营养的需要, 而无需摄取外源性营养^[5]。卵黄的组成十分复杂, 包括蛋白质、脂类、碳水化合物、游离脂肪酸、核苷酸和核酸等物质, 其中卵黄蛋白 (vitellin) 是卵黄中的主要组成物质^[6]。目前, 对于关于鲟鱼卵黄蛋白的研究, 只有小体鲟^[7]、杂交鲟^[5]和施氏鲟^[8]中有过报道。对中华鲟卵黄蛋白的研究尚未见报道。本研究分离纯化了中华鲟卵黄脂磷蛋白, 并对其部分理化性质及氨基酸组成等方面进行了研究, 为进一步了解鲟科鱼类的卵黄发生、调控机理和中华鲟初始生长发育机制提供一些理论基础, 对中华鲟的保护和繁殖具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 实验动物

2007 年 6 月 15 日浙江宁波石浦镇, 东经 123°35',

北纬 31°31' 处拖网误捕野生成熟雌性中华鲟 (长约 3.18 m, 质量 215 kg), 受伤死亡后解剖收集中华鲟鱼卵并去除其内附脂肪, 用缓冲液 (20 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0) 冲洗干净, 于 -80 超低温冰箱中保存待用。

1.1.2 主要试剂

低分子质量标准蛋白购自大连宝生物工程有限公司, 成分为兔磷酸化酶 B 97.4 ku, 牛血清白蛋白 66.2 ku, 兔肌动蛋白 43.0 ku, 牛碳酸酐 31.0 ku, 胰蛋白酶抑制剂 20.1 ku; Sephacryl S-300 购自 GE Healthcare 公司; 叠氮钠和苯甲基磺酰氟购自上海捷瑞生物工程有限公司; 甲基绿、碱性品红和油红 O 为国药集团化学试剂有限公司产品。其他试剂为进口分装或国产。

1.2 实验方法

1.2.1 中华鲟全卵粗提液的制备

取中华鲟鱼卵 50 g, 加入 2 倍体积预冷的匀浆缓冲液 (20 mmol/L Tris-HCl 含 0.1 mol/L NaCl, 0.01% 的叠氮钠、0.1 mmol/L 苯甲基磺酰氟, pH 8.0)。用玻

收稿日期: 2009-07-23; 修回日期: 2009-11-25

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30490234); 上海市教委 E-研究院建设项目 (E03009); 长江口中华鲟自然保护区专项; 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项 (2007M01, 2007M023)

作者简介: 庄平 (1960-), 男, 湖南桃源人, 研究员, 博士, 主要从事水生动物生理生态学和保护生物学研究, E-mail: pzhuang@online.sh.cn

璃匀浆器在冰浴条件下初步研碎后, 4 条件下超声波细胞粉碎机破碎(宁波新芝超声波细胞破碎机, 工作 15 次, 每次持续时间 3 s)。匀浆液在 4 条件下经 12 000 g 离心 15 min, 取中间层清液用 0.45 μm 微孔滤膜过滤后用于层析分离。

1.2.2 凝胶过滤层析

取卵蛋白粗提取液上柱, 选取丙烯葡聚糖凝胶 Sephacryl S-300 作为填料, 柱子规格为(1.6 cm \times 70 cm), 用 20 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH8.0, 含 0.1 mol/L NaCl)匀速洗脱, 洗脱流速 0.8 mL/min。采用上海精科公司 HD-9704 型核酸蛋白检测仪在线检测(波长定于 280 nm), 电脑自动记录洗脱曲线。自动分部收集器以每管 2 mL 收集各洗脱峰, 洗脱完毕合并主峰。

1.2.3 离子交换层析

将样品上柱, 选取阴离子交换树脂 DEAE-Sephacryl Fast Flow 作为填料自行装柱(1.6 cm \times 20 cm), 用分别含有 0.1、0.2、0.3、0.4 和 0.5 mol/L NaCl 的 Tris-HCl 缓冲液(20 mmol/L, pH 8.0), 以 2 mL/min 流速进行分部洗脱, 280 nm 处蛋白紫外检测仪在线检测。自动分部收集器以每管 3 mL 收集各洗脱峰, 洗脱完毕合并主峰。将可能的卵黄脂磷蛋白样品放入透析袋中脱盐 24 h, 然后采用 EYELA FDU-1100 型冷冻干燥机对收集液进行浓缩(-45 $^{\circ}\text{C}$, 10 Pa)。

1.2.4 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳

将浓缩的各洗脱峰分别进行变性聚丙烯酰胺电泳。分离胶质量分数为 12%, 浓缩胶质量分数为 4%, 样品与上样缓冲液以 4:1 混合, 浓缩电压 100 V, 分离电压恒定为 180 V。待指示剂距分离胶末端 0.5 cm 处停止电泳。电泳后的凝胶用固定液(甲醇:冰醋酸:蒸馏水=5:1:4)浸泡 2 h, 然后于 0.1% 考马斯亮蓝 R-250 染色 2 h, 再在脱色液(甲醇:冰醋酸:蒸馏水=1:1:8)中脱色至背景清晰^[9]。用 BIO-RAD 凝胶成像系统拍照保存。所分离的蛋白质的分子质量采用 BIO-RAD 凝胶图像分析软件 Quantity One Version 4.5.2 完成。

1.2.5 脂蛋白特性鉴定

参照 Noble 等^[10]的方法。将电泳后的凝胶放入 5% 乙酸中固定 20 min, 用水冲洗数次后, 放入油红 O 染液中过夜, 第二天将凝胶在 60% 酒精中浸洗 5 min, 最后用蒸馏水冲洗以除去底色, 用佳能数码相机拍照保存。

1.2.6 磷蛋白特性检测

参照 Cutting 等^[11]的方法。将电泳后的凝胶转

入 10% 磷基水杨酸中固定 1 h, 在 60 $^{\circ}\text{C}$ 条件下, 经 0.5 mol/L NaOH 溶液浸浴 30 min 后, 用 1% 钼酸铵洗涤 10 min, 然后再采用 1 mol/L HNO₃ 配置的 1% 钼酸铵溶液染色 30 min。最后用 0.5% 甲基绿染色液染色 30 min, 经 10% 磷基水杨酸脱色至磷蛋白条带清晰为止。

1.2.7 糖蛋白特性检测

参照 Fairbanks^[12]和 Sun 等^[13]的方法。将电泳后的凝胶放入 15% 的三氯乙酸中, 4 $^{\circ}\text{C}$ 下振荡过夜; 然后将凝胶放入 0.5% 的高碘酸中振荡 2 h。随后将凝胶移入 20 mmol/L 的高碘酸钠溶液中, 30 min 后用 5 mmol/L 高碘酸钠溶液洗涤 2 次, 每次 20 min。再用 5% 的乙酸洗涤 10 min, 将洗涤后的凝胶放入 Schiff 试剂中染色过夜。最后用 5 mmol/L 的 Na₂S₂O₅ (内含 10 mmol/L HCl) 溶液对凝胶进行漂洗, 至背景不再显示粉红色。

1.2.8 氨基酸组成分析

取适量卵黄脂蛋白样品于 6 mol/L HCl 中消化 24 h, 充氮气, 封管; 在 110 $^{\circ}\text{C}$ 条件下水解 24 h。开管, 样品抽真空干燥, 去离子水洗。水解后氨基酸样品用缓冲液稀释后上机, 用 Biochrom 20 型氨基酸自动分析仪分析测定其氨基酸组分及含量。

2 结果

2.1 卵粗提液 SDS-PAGE 电泳

中华鲟全卵粗提液经 12% SDS-PAGE 电泳后共得 6 条带(图 1), 分子质量分别是 64.3、43.5、37.4、26.1、17.4 和 15.6 ku, 其中分子质量为 43.5 ku 的蛋白电泳为主带型。

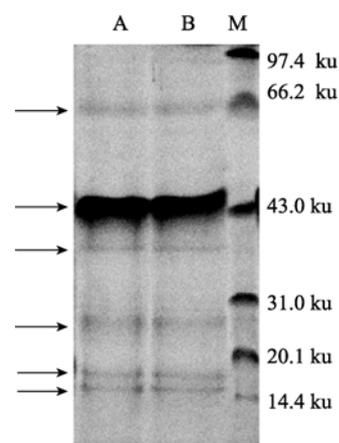


图 1 中华鲟卵粗提液 SDS-PAGE 电泳图谱

Fig. 1 SDS-PAGE of the crude egg extract of *Acipenser sinensis*
M: 标准蛋白; A, B: 中华鲟卵粗提液
M: Protein markers; A, B: Crude egg extract

2.2 卵黄蛋白的分离纯化

卵粗提液经 Sephacryl S-300 凝胶过滤层析的洗脱曲线如图 2 所示, 共得到 A、B、C 和 D 4 个洗脱峰。各峰之间分离效果良好, 经 SDS-PAGE 电泳后发现峰 B 有明显大分子主带出现。由于鱼卵中主要蛋白均为大分子质量的 L_v , 从而初步推测峰 B 中可能含有 L_v , 将峰 B 进一步经 DEAE 离子交换层析分离, 采取梯度洗脱如图 3), 对各峰脱盐浓缩后做进一步特异染色鉴定, 确定峰 即为中华鲟 L_v 。

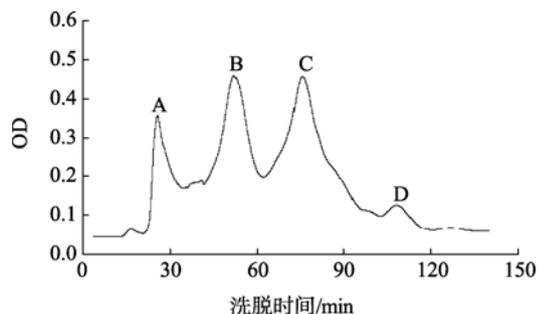


图 2 中华鲟卵粗提液 Sephacryl S-300 洗脱曲线

Fig. 2 Separation of the crude egg extract of *Acipenser sinensis* by gel filtration chromatography on a Sephacryl S-300 column

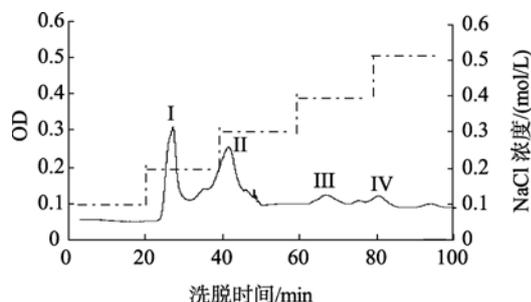


图 3 峰 B 蛋白 DEAE 离子交换层析洗脱曲线

Fig. 3 Further separation of fraction B by a DEAE column

2.3 峰 II 蛋白 SDS-PAGE 电泳分析

卵粗提液经凝胶过滤层析初步分离得到的峰 B 进行 SDS-PAGE 电泳分析结果见图 4, 将峰 B 作进一步离子交换层析后纯化所得的峰 II 进行 SDS-PAGE 电泳分析(图 5), 结果显示为单一条带, 表明中华鲟 L_v 是由一种表观分子质量为 43.5 ku 的亚基构成。

2.4 糖、脂、磷蛋白特异染色

纯化所得的中华鲟 L_v 经 Schiff、油红 O 和甲基绿-钼氨酸特异染色(图 6), 峰 蛋白均呈现阳性反应, 磷蛋白、脂蛋白和糖蛋白均在蛋白图谱的同一位置出现相同的带, 表明纯化所得峰 蛋白确是一种

卵黄脂磷蛋白。

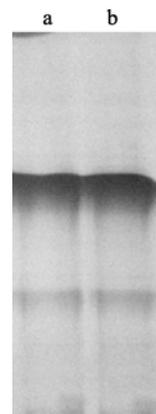


图 4 峰 B 蛋白 SDS-PAGE 图谱

Fig. 4 SDS-PAGE of proteins in fraction B

a, b: 峰 B 蛋白; M: 标准蛋白

a, b: Proteins in fraction B; M: Protein markers

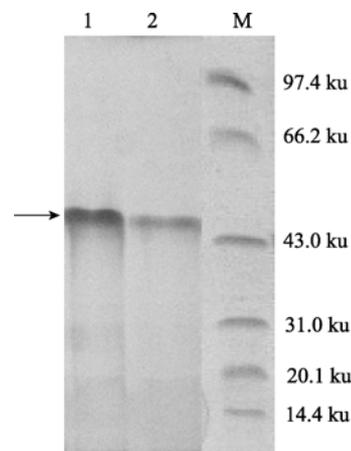


图 5 峰 蛋白 SDS-PAGE 图谱

Fig. 5 SDS-PAGE of fraction

1, 2: 峰 蛋白; M: 标准蛋白

1, 2: Protein in peak II; M: Protein markers

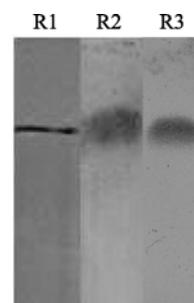


图 6 峰 蛋白特异染色

Fig. 6 Specific stains of protein in fraction

R1. 糖蛋白特异染色; R2. 脂蛋白特异染色; R3. 磷蛋白特异染色

R1. Glycosidoprotein stain; R2. Lipoprotein stain; R3. Phosphoprotein stain

2.5 Lv 氨基酸组成分析

将中华鲟 Lv 的氨基酸组成与西伯利亚鲟 (*A.baerii*)^[14]、哲罗鱼 (*Hucho taimen*)^[15] 和虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*)^[16] 的比较结果见表 1。结果显示, 中华鲟 Lv 中必须氨基酸质量分数(57.19%)高于

非必须氨基酸质量分数(42.81%)。其中天冬氨酸(11.28%)、谷氨酸(10.29%)、亮氨酸(9.31%)和缬氨酸(8.56%)含量较高, 占氨基酸总质量的 39.44%。含量最少的是半胱氨酸, 为蛋白含量的 0.71%, 其次含量较少的是甲硫氨酸, 约占总量的 0.85%。

表 1 中华鲟卵黄脂磷蛋白的氨基酸组成与其他鱼的比较(质量分数, %)

Tab. 1 Amino acid composition of Lv purified from *Acipenser sinensis* (weight %)

氨基酸	中华鲟 <i>Acipenser sinensis</i>	西伯利亚鲟 <i>Acipenser baerii</i>	哲罗鱼 <i>Hucho perryi</i>	虹鳟 <i>Oncorhynchus mykiss</i>
天冬氨酸	11.28	12.19	6.66	7.60
苏氨酸	6.09	5.67	5.39	5.29
丝氨酸	5.35	9.60	4.22	4.77
谷氨酸	10.29	11.01	10.63	11.51
甘氨酸	3.85	4.40	4.37	4.02
丙氨酸	4.85	3.59	13.61	14.13
半胱氨酸	0.71	1.70	nd	0.80
缬氨酸	8.56	7.38	8.10	7.63
甲硫氨酸	0.85	0.76	0.86	2.54
异亮氨酸	5.07	5.35	6.64	5.87
亮氨酸	9.31	6.71	10.22	10.33
酪氨酸	5.84	5.28	3.23	2.87
苯丙氨酸	5.72	4.30	4.42	4.60
组氨酸	2.26	2.51	2.13	2.19
赖氨酸	6.92	11.62	6.59	6.23
精氨酸	7.06	4.59	8.02	4.38
脯氨酸	6.00	3.35	4.91	5.32
总和	100.00	100.01	100.00	100.08

注: nd 表示未检出

3 讨论

Lv 是鱼类卵黄中的主要组成物质, 分子质量从 30 ku 到 120 ku 不等^[17]。卵黄形成主要有两种方式: 一是可以在卵母细胞本身中合成, 称为内源卵黄合成; 二是在卵母细胞以外的地方合成, 然后入卵母细胞, 称为外源性卵黄合成。在卵黄形成期, 鱼类在雌激素作用之下, 由肝脏合成卵黄蛋白原 (vitellogenin, Vtg) 后, 分泌到血液中, 由血液运送到卵巢, 在成熟的卵母细胞中裂解成 2 个主要的卵黄蛋白成分: Lv 和卵黄高磷蛋白(Phosvitin, Pv), 还有一些小的蛋白和多肽^[18]。

目前普遍用于分离纯化 Lv 的方法很多, 主要有 EDTA 加 MgCl₂ 分级沉淀、凝胶过滤层析、离子交换层析、亲和层析和电泳法等^[19]。现在已有若干鱼

类的 Lv 被纯化鉴定。张年国等^[8]对施氏鲟的 Lv 研究表明, 其是由一种分子质量为 30 ku 的亚基构成。日本鳗鲡(*Anguilla japonica*)的一种 Lv 是由 4 个分子质量为 85 ku 的亚基构成^[20]。Fenske 等^[21]对斑马鱼 (*Danio rerio*) 的 Lv 研究表明, 其是由 2 种分子质量分别为 90 ku 和 86 ku 的肽链构成。姚静等^[22]对唐鱼 (*Tanichthys albonubes*) 的研究也表明, 其 Lv 是由分子质量分别为 98、96 和 71 ku 的 3 种亚基构成。

本实验中华鲟的卵粗提液经 SDS-PAGE 电泳, 发现其由 6 个不同种亚基组成, 亚基分子量分别为 64.3、43.5、37.4、26.1、17.4 和 15.6 ku, 这表明 Vtg 进入卵母细胞后, 被蛋白酶水解成若干小分子的蛋白。在不同的物种或同属不同种之间, 因为胚胎发育存在差异, 其所需的营养成分及其含量各不一样, 在卵巢的卵母细胞发育过程中卵黄蛋白原经过不同

形式的加工形成了卵黄蛋白的多样性^[17]。

通过选择采用凝胶过滤与离子交换两步层析法结合使用来分离纯化中华鲟卵中的 Lv, 在 4 和 0.2 mmol/L 蛋白酶抑制剂 PMSF 的条件下, 各峰之间分离效果明显, 电泳分析表明, 很好地达到了纯化中华鲟 Lv 的目的。经 SDS-PAGE 电泳分析表明其是由一种表观分子质量为 43.5 ku 的亚基构成。对分离纯化得到的中华鲟 Lv 进行糖、磷、脂特异性染色, 结果均为阳性, 进一步证实了中华鲟 Lv 是一种糖脂磷蛋白, 这与西伯利亚鲟、施氏鲟和杂交鲟等^[7,8,14]鱼类的 Lv 含丰富的糖、脂和磷的特点一致。

对中华鲟 Lv 中的氨基酸组成进行了分析, 证明中华鲟 Lv 是一种含有相对较多天冬氨酸、谷氨酸、亮氨酸和缬氨酸的蛋白, 占到了氨基酸总质量的 39.44%。这与西伯利亚鲟(*A.baerii*)^[14]Lv 中, 天冬氨酸、谷氨酸、亮氨酸和缬氨酸占氨基酸总质量的 (37.29%) 十分类似。通过对这两种鲟鱼和其他鱼种 Lv 中氨基酸组成进行分析发现, 亲缘关系较近的中华鲟与西伯利亚鲟 Lv 中其氨基酸组成及含量十分相似, 而与亲缘关系较远的哲罗鱼^[15]和虹鳟^[16]的 Lv 差别较大。其中中华鲟 Lv 中天冬氨酸含量显著高于哲罗鱼与虹鳟, 而丙氨酸含量相比则明显偏少。另外发现中华鲟 Lv 与已研究过的虹鳟鱼 Lv 中都有半胱氨酸被检出, 可能主要与 Lv 中二硫键的形成有关, 进而也证实了 Lv 是由多个亚基构成的一种复杂蛋白。这种复杂蛋白的发生和合成机制还有待于进一步研究。

参考文献:

- [1] 李大鹏, 刘松岩, 谢从新, 等. 水温对中华鲟血清活性氧含量及抗氧化防御系统的影响[J]. 水生生物学报, 2008, 32(3): 327-332
- [2] 宋超, 庄平, 章龙珍, 等. 野生及人工养殖中华鲟幼鱼肌肉营养成分的比较[J]. 动物学报, 2007, 53(3): 502-510.
- [3] 唐国盘, 刘建毅, 危起伟, 等. 中华鲟胚胎的耗氧率[J]. 动物学杂志, 2004, 39(5): 30-34.
- [4] Hiramatsu N, Hiramatsu K, Hirano K, *et al.* Vitellogenin-derived yolk proteins in a hybrid sturgeon, bester (*Huso huso* × *Acipenser ruthenus*): Identification, characterization and course of proteolysis during embryogenesis[J]. *Comp Biochem Physiol A*, 2002, 131: 429-441.
- [5] 张成锋, 蔡生力. 对虾卵黄蛋白的生化性质及卵黄蛋白原合成部位的研究进展[J]. 上海水产大学学报, 2003, 12(2): 168-173.
- [6] Hara A, Matsubara T, Sancyashi M, *et al.* Vitellogenin and its derivatives in egg yolk proteins of white-spotted char (*Salvelinus leucomaenis*) [J]. *Bull Fac Fish Hokkaido Univ*, 1984, 35: 144-153.
- [7] 霍堂斌, 张颖, 孙大江, 等. 小体鲟卵黄雌性蛋白分离纯化及抗血清的研制[J]. 中国水产科学, 2007, 14(4): 532-537.
- [8] 张年国, 张颖, 曲秋芝, 等. 施氏鲟卵黄蛋白的分离纯化及其性质[J]. 中国水产科学, 2007, 14(2): 309-314.
- [9] 汪家政. 蛋白质技术手册[M]. 北京: 科学出版社, 2005. 53-59.
- [10] Noble R P, Hatch F T, Marzimas J A, *et al.* Comparison of lipoprotein analysis by agarose gel and paper electrophoresis with analytical ultracentrifugation [J]. *Lipids*, 1969, 4(1): 55-59.
- [11] Cutting J A, Roth T F. Staining of Phosphoproteins on acrylamide gel electropherograms [J]. *Anal Biochem*, 1973, 54: 386-394.
- [12] Fairbanks G, Steck T L, Wallice D, *et al.* Electrophoretic analysis of the major polypeptide of the Human erythrocyte membrane [J]. *Biochem*, 1971, 10: 2 606-2 617.
- [13] Sun X T, Zhang S C. Purification and characterization of a putative vitellogenin from the ovary of amphioxus (*Branchiostoma belcheri tsingtaunese*) [J]. *Comp Biochem Physiol B*, 2001, 129: 121-127.
- [14] 丁建文, 庄平, 章龙珍, 等. 西伯利亚鲟卵黄脂磷蛋白的分离纯化及性质[J]. 动物学杂志, 2009, 44(3): 9-15.
- [15] Hiramatsu N, Hara A. Relationship between vitellogenin and its related egg yolk proteins in Sakhalin Taimen (*Hucho perryi*) [J]. *Com Biochem Physiol A*, 1996, 115: 243-251.
- [16] Mourot B, Le Bail P Y. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) vitellogenin [J]. *Immunoassay*, 1995, 16(4): 365-377.
- [17] 张士瑾, 孙旭彤, 李红岩, 等. 卵黄蛋白原研究进展[J]. 海洋科学, 2002, 26(7): 32-35.
- [18] Byrne B M, Gruber M. The evolution of egg yolk protein [J]. *Prog Biophys Mol Biol*, 1989, 53: 33-69.
- [19] Shi G Q, Shao J, Jiang G, *et al.* Membrane chromatographic method for the rapid purification of vitellogenin from fish plasma [J]. *Chromatography*, 2003, 785: 361-368.
- [20] Hara A. Study on female-specific serum proteins (vitellogenin) and egg yolk proteins in teleosts: immunochemical, phytochemical and structural studies [J]. *Mem Fac Hokkaido Univ*, 1987, 34: 1-59.
- [21] Fenske M, Aerie R V, Brack S, *et al.* Development and validation of a homologous zebrafish (*Danio rerio* Hamilton-Buchanan) vitellogenin enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and its application for studies on estrogenic chemicals [J]. *Comp Biochem Physiol C*, 2001, 129: 217-232.
- [22] 姚静, 方展强, 徐杰, 等. 唐鱼卵黄脂磷蛋白的纯化与免疫原性分析[J]. 应用与环境生物学报, 2008, 14(2): 69-73.

Purification and partial characterization of lipovitellin from *Acipenser sinensis*

ZHUANG Ping^{1, 2}, DING Jian-wen^{1, 2}, HOU Jun-li¹, ZHANG Long-zhen¹, LIU Jian-yi¹, LIU Jian³, ZHANG Tao¹, Tian Mei-ping¹

(1. East Fishery Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Shanghai 200090, China; 2. East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China; 3. Superintendence Department of Shanghai Yangtze Estuarine Natural Reserve for Chinese Sturgeon, Shanghai 200002, China)

Received: Jul., 23, 2009

Key words: *Acipenser sinensis*; lipovitellin; Gel filtration chromatography; Anion exchange chromatography

Abstract: Lipovitellin was purified from *Acipenser sinensis* using Sephacryls-300 gel filtration chromatography and DEAE anion exchange chromatography. The purified protein in fraction was a monomer of approximate 43.5 ku on SDS-PAGE. Oil red O, methyl green, and the Schiff staining reagents indicated that this protein was a lipo-phospho-glycoprotein. Amino acid analysis showed that lipovitellin of *A. sinensis* had relatively high contents of asparagines acid, glutamic acid, leucine acid, and valine acid.

(本文编辑: 康亦兼)

(上接第 5 页)

Primary culture of oyster (*Crassostrea hongkongensis*) gill cells

WANG Bin, ZHANG Qi-zhong

(Hydrobiology Institute of Jinan University, Engineering Research Center of Tropical and Subtropical Aquatic Ecological Engineering Ministry of Education, Key Laboratory of Aquatic Eutrophication and Control of Harmful Algal Blooms of Guangdong Higher Education Institutes, Guangzhou 510632, China)

Received: Sep., 12, 2009

Key words: *Crassostrea hongkongensis*; gill cells; tissue culture; trypsinization

Abstract: The gill cells derived from oyster (*Crassostrea hongkongensis*) were cultured *in vitro* with the modified medium DMEM (HG) by means of both gills tissue culture and trypsinization methods. In the gills tissue culture method, the small cells, which were rounded, elliptic or polygonal with diameters of 3 ~ 6 μm , began to migrate out from the gills tissue at 6 h post-inoculation. The cell layers appeared around the tissues at 3 d post-inoculation, and could be subcultured at 6 days. In present study, the gill cells had been subcultured to the sixth generation. In the trypsinization method, most gill cells were adherent at 2 h post-inoculation of trypsinization. The cells could be morphologically divided into two groups including small cells with diameters of 3 ~ 6 μm and large cells with diameters of 10 ~ 20 μm . The two groups of cells were all rounded, elliptic or polygonal; some of the large cells were granular cells. The small cells were more than the large cells in number. Being cultured for 2 d, the gill cells could be subcultured. In the present study, the gill cells had been subcultured to the sixth generation.

(本文编辑: 梁德海)